Ueber komplexe Eisencyanide als Reagenzien zum Nachweis der Ketonkörper

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

Werner LANZ

von Huttwil
(Bern)

•

Buchdruckerei Otto Lanz, Bern · 1942

Ueber komplexe Eisencyanide als Reagenzien zum Nachweis der Ketonkörper

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

Werner LANZ

von Huttwil
(Bern)

•

Buchdruckerei Otto Lanz, Bern - 1942

Auf Antrag der Herren Prof. Dr. *E. Bürgi* und Prof. Dr. *J. Abelin* von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, im März 1941.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. Bluntschli

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Bis heute fand ein einziges komplexes Eisencyanid zum Nachweis der Ketonkörper im Harn Verwendung. Es handelt sich um das Nitroprussidnatrium, das in zwei Reaktionen, der Lange'schen zum Acetonnachweis, sowie in der Legal'schen zum Nachweis von Aceton und Acetessigsäure *zusammen* verwendet wird.

In neuerer Zeit hat Lipp[1] ein Trockenreagenz zum Acetonnachweis in den Handel gebracht, dessen Zusammensetzung er nicht angibt, von dem er aber sagt, dass es auch Nitroprussidnatrium enthält.

Es ist verwunderlich, dass zum Nachweis der Acetessigsäure *allein* kein komplexes Eisensalz verwendbar erschien. Bekanntlich dient dazu die Gerhardt'sche Reaktion mit Ferrichlorid.

Wir werden im Folgenden sehen, dass es sowohl auf „nassem" Wege, als auch unter Verwendung eines Trockenreagenz, das Ferricyankalium enthält, möglich ist, Acetessigsäure qualitativ zu erfassen.

Erstere Methode bietet natürlich gegenüber der Gerhardt'schen Reaktion keinen Vorteil. Wenn wir aber ein brauchbares Trockenreagenz herstellen können, das der Praktiker am Krankenbett oder der Truppenarzt im Felde verwenden kann, so ist sein Vorteil einleuchtend.

Wir haben somit bereits die Möglichkeit, mit Trockenreagenzien zwei Ketonkörper nachzuweisen. Der dritte, die β-Oxybuttersäure, ist chemisch jedenfalls nicht schwerer nachzuweisen, als die beiden andern. Emden & Schmitz, sowie Hart[2] haben Methoden beschrieben, die darin bestehen, das flüchtige Aceton und die Acetessigsäure zu verdampfen, die nicht verdampfbare β-Oxybuttersäure durch Wasserstoffperoxyd in Acetessigsäure zu oxydieren und letztere nachzuweisen.

Die meisten Autoren selbst moderner Leitfäden, welche die Harnanalyse behandeln (Lipp[1], Weiss[3], Agasse-Lafont[4], Stockbauer[5]), scheinen sie nicht mehr zu kennen und erwähnen nur den polarimetrischen Nachweis, oder begnügen sich mit der Angabe: „Wenn Acetessigsäure nachgewiesen ist, so ist auch β-Oxybuttersäure vorhanden" (Lipp).

Wir werden sehen, dass es unter Verwendung eines dritten Trockenreagens, eines Oxydationsmittels, in einfachster Weise, nach Verdampfen der flüchtigen Ketonkörper, möglich ist, die β-Oxybuttersäure zu oxydieren und als Aceton nachzuweisen. Durch die Notwendigkeit verschiedener Manipulationen wird natürlich die Methode in das Laboratorium verwiesen. Wenn aber sowohl die Kontrolle der vollständigen Austreibung, als auch die Oxydation mit Trockenreagenzien ausgeführt werden können, so resultiert eine Vereinfachung, die es ermöglicht, ohne grosse Kenntnisse chemischer Manipulationen auszukommen.

Vor einigen Jahren haben wir uns die Aufgabe gestellt, *sämtliche* gebräuchlichen qualitativen Harnanalysen durch Trockenreagenzien zu ermöglichen. Die Firma Pharmedica, Lausanne, bringt eine Zusammenstellung in einem Etui unter dem Namen „UroLabo" in den Handel, die nach unseren Angaben hergestellt ist. Eine Broschüre, „Analyse qualitative des urines au moyen de réactifs solides" (Berne, 1938, Otto Lanz, imp.), behandelt sämtliche Reaktionen, die ausführbar sind.

Wir werden uns im Folgenden nur mit den neuen Reagenzien zum Nachweis der Ketonkörper befassen. Zum Verständnis ist es natürlich notwendig, auch die „klassischen" Methoden vergleichend zu betrachten.

Die klinisch-semiologische Seite der Ketonurie lassen wir beiseite. Es sei nur eine praktische wichtige Frage kurz diskutiert, nämlich, ob wir uns nicht damit begnügen könnten, die Acetonurie nachzuweisen, oder wie Agasse-Lafont meint, die Gegenwart von Acetessigsäure nach Gerhardt.

Bekanntlich ist die Diacetsäure die „mittlere" Verbindung, d. h. sie entsteht aus der im pathologischen Stoffwechsel gebildeten β-Oxybuttersäure durch Oxydation. Aus ersterer aber entsteht durch Abspaltung von CO_2 Aceton.

Schematisch haben wir folgende Relation (nach Sahli[6]):

$CH_3 - CHOH - COOH = \beta$-Oxybuttersäure

↓ Oxydation

$CH_3 - C = O - CH_2 - COOH$ = Acetessigsäure

Abspaltung von CO_2

$CH_3 - C = O - CH_3$ = Aceton

Wenn wir uns nicht nur mit dem Nachweis des Bestehens einer Acidose begnügen, sondern auch deren Intensität abschätzen wollen, wie dies z. B. für die Insulintherapie eines Komas laufend notwendig ist, so müssen wir sicherlich die drei Acidosekörper einzeln berücksichtigen.

Wenn wir in kurzen Intervallen frisch gewonnenen Harn untersuchen, so ist bestimmt die Annahme:

Aceton allein = leichte Acidose
Aceton + Acetessigsäure = schwererer Grad
Vorige + β-Oxybuttersäure = schwere Acidose

vollauf berechtigt, mit wenigen Ausnahmen (siehe nachstehend unter Acetessigsäure Seite 24).

Acetonnachweis.

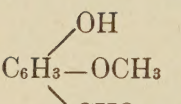
Legal[7] beschrieb seine Reaktion 1883. von Bitto[8] berichtete in ausführlicher Weise 9 Jahre später „über das Nitroprussidnatrium als Reagens auf Aldehyde und Ketone". Er verwendet Nitroprussidnatrium in alkalischer Lösung und studiert ferner den Einfluss von Säurezusatz, nach dem Entstehen der primären Färbung. Eine Rotfärbung mit Nitroprussidnatrium + Alkali entsteht, wenn die Aldehydgruppe — CHO oder die Ketogruppe — CO direkt an eine Gruppe gebunden ist, die nur aus C und H besteht. Das einfachste Aldehyd der *aliphatischen* Reihe, das Formaldehyd H — CHO ergibt sie nicht. Ebenfalls nicht das Chloral CCl_3 — CHO, das Butylchloral CH_3 — CHCl — CCl_2 — CHO und auch nicht das Glyoxal OHC — CHO.

Ueber die Aldehyde und Ketone der *aromatischen* Reihe berichtet der Autor folgendes: Die rote Reaktion tritt *nicht* ein, wenn keine anderen Gruppen als — CHO und — CO an das

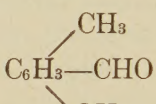
aromatische Radikal gebunden sind. Sind aber neben diesen Gruppen andere Radikale der aliphatischen Reihe, nur aus C und H bestehend, vorhanden, so tritt Rotfärbung ein, z. B. für $C_3H_7 — C_6H_4 — CHO$. Ebenso tritt sie auf, wenn die — CHO oder — COCO-Gruppe sich auf einer Seitenkette befindet und hier benachbart ist mit einer Gruppe, die nur aus C und H besteht, also z. B. für $C_6H_3 — CH = CH — CHO$. Keine Rotfärbung gibt also:

$C_6H_5 — CHO$ Benzaldehyd

O-Oxybenzaldehyd



Vanillin



p-Homosalicylaldehyd

Von aromatischen *Ketonen*, die von Bitto untersucht hat, geben *keine* rote Reaktion

$C_6H_5 — CO — C_6H_5$ Benzophenon

$OH — C_6H_4 — CO — C_6H_3(OH)_2$ Trioxybenzophenon

$C_6H_5 — CO — C_6H_5 — CO — C_{10}H_7$ Naphtylphenylketon

$C_6H_5 — CO — CO — C_6H_5$ Benzil

Folgende Ketosäuren, die von Bitto untersuchte, ergeben Rotfärbungen:

$CH_3 — CO — CH_2 — COOH$ Acetessigsäure

$CH_3 — CO — CH(C_2H_5)COOH$ Aethylacetessigsäure

$CH_3 — CO — COOH$ Brenztraubensäure.

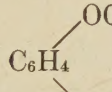
Setzen wir, nach Auftreten der Rotfärbung, eine organische Säure (z. B. Essigsäure, wie bei der Legal'schen Reaktion) oder Metaphosphorsäure zu, so verschwindet die Rotfärbung bei einer Anzahl von Verbindungen mehr oder weniger rasch. Von aliphatischen Aldehyden ergeben ein Verschwinden der Rotfärbung und Auftreten einer gelben Färbung: Acetaldehyd, Paraldehyd, Furfurol.

Keine Entfärbung tritt ein bei Crotonaldehyd:

$CH_3 — CH = CH — CHO.$

Dieses Aldehyd ergibt auf Nitroprussiat + Alkali eine rotviolette, intensive Färbung, die auf Säurezusatz bleibt.

Ueberhaupt kann gesagt werden, dass für die oben erwähnten Verbindungen recht verschiedene Nuancen der Rotfärbung mit Nitroprussidnatrium + Alkali auftreten, die von orangerot, kirschrot, dunkelrot bis rotbraun variieren. Dasselbe gilt auch für die aromatischen *Aldehyde.* Auf Säurezusatz findet ein mehr oder weniger rasches Verschwinden der Rotfärbung statt, so z. B. für



C_6H_4 Anisaldehyd

$C_6H_5 — CH = CH — CHO$ Zimtaldehyd.

Von aliphatischen *Ketonen* untersuchte von Bitto

$CH_3 — CO — CH_3$ Aceton
$CH_2Cl — CO — CH_3$ Chloraceton
$C_2H_5 — CO — C_2H_5$ Diæthylketon
$CH_3 — CO — C_3H_7$ Methylpropylketon
$CH_3 — CO — C_6H_{13}$ Methylhexylketon
$CH_3 — CO — C_9H_{19}$ Methylnoylketon.

Bei diesen allen entsteht auf Säurezusatz nach Auftreten der Rotfärbung *keine* Entfärbung, wohl aber ein Rotviolettfärbung. Wir kennen sie als Rotviolettfärbung bei der Legal'schen Reaktion. Eine Ausnahme macht das Methylnonylketon, das auf Säurezusatz keine dunklere Färbung ergibt, sondern eine Rosafärbung.

Aromatische Ketone:

$CH_3 — CO — C_6H_5$ Acetophenon
$CH_2Br — CO — C_6H_5$ Monobromacetophenon
$C_6H_5 — CH = CH — CO — CH_3$ Benzylidenaceton

verhalten sich insofern anders, als die Rotfärbung auf Säurezusatz in violette bis blauviolette Färbungen übergeht.

Die Ketosäuren, die wir vorhin erwähnten, ergeben auf Säurezusatz nach der Rotfärbung mit Nitroprussid und Alkali *kein*

Verschwinden der Rotfärbung. Eine Ausnahme macht die Brenztraubensäure,deren kirschrote Reaktion verschwindet.

Wir sehen aus Vorhergehendem, dass die Nitroprussidnatriumreaktion eingehend studiert worden ist, und dass eine ganze Reihe von Verbindungen eine rote Reaktion ergeben. Die uns interessierenden, Aceton und Essigsäure, ergeben zudem auf Säurezusatz kein Verschwinden der Rotfärbung. Fügen wir gleich hier hinzu, dass das *Kreatinin*, das mit Nitroprussiat + Alkali ebenfalls eine Rotfärbung ergibt (Weil'sche Kreatininreaktion) die Rotfärbung auf Säurezusatz verliert. Wir weisen also mit der Legal'-von Bitto'schen Reaktion im Harn *nur* Aceton und Acetessigsäure nach.

Bevor wir uns weiter in der Literatur umsehen, wollen wir darauf hinweisen, dass die Ausführungsweise der Legal'schen Reaktion von primordialer Wichtigkeit ist. Um dies zu illustrieren stellen wir folgende Versuche an:

1. ca. 5 cc Kreatininlösung 1/1000 werden mit 3—4 Tropfen konzentrierter Nitroprussidnatriumlösung versetzt. Wir fügen 4 Tropfen 30%ige Natronlauge hinzu. Es entsteht eine Rotfärbung. Setzen wir weiter Lauge zu, so findet eine progressive Entfärbung statt. Nach Zufügen von ca. 0,5 cc Lauge bleibt eine Gelbfärbung.
2. 5 cc Acetonlösung 1/1000 werden in gleicher Weise behandelt. Auf Laugenzusatz findet eine Entfärbung *nicht* statt, auch nicht, wenn ein Ueberschuss von mehreren cc Lauge zugesetzt wird. Die Rotfärbung wird höchstens etwas blasser, entsprechend der Verdünnung durch die Vermehrung der Flüssigkeitsmenge.
3. 5 cc Acetessigäther (der sich gleich verhält wie die Acetessigsäure) in Wasser 1/1000 gelöst, werden in gleicher Weise behandelt. Auf Laugenüberschuss macht die Rotfärbung, wie für Kreatinin, einer gelben Platz.
4. Eine Mischung von Kreatinin- und Acetessigsäurelösung ergibt ebenfalls eine Gelbfärbung auf Laugenüberschuss.

Aus obigen Versuchen ergibt sich die wichtige praktische Forderung für die Legal'sche Reaktion, dass der Laugenzusatz

wenige Tropfen nicht überschreiten darf, soll neben dem Aceton auch Acetessigsäure nachgewiesen werden.

Ist die mit Acetessigsäure erhaltene Rottärbung durch Laugenüberschuss zum Verschwinden gebracht worden, so erzeugt sie ein Säurezusatz nicht wieder.

Andrerseits ergibt sich nach obigen Versuchen die Möglichkeit, mit Hilfe der normalen Legal'schen Reaktion (mit Säurezusatz) die Aceton und Acetessigsäure zusammen erfasst, und der modifizierten mit Laugenüberschuss (ohne Säurezusatz) die nur das Aceton erfasst, die Acetessigsäure quantitativ abzuschätzen, wenn wir die eine und die andere Reaktion kolorimetrisch auswerten und die Differenz errechnen.

Anstelle von Natron- oder Kalilauge kann man zum Ausführen der Legal'schen Reaktion konzentrierte Kalium- oder Natriumkarbonatlösung verwenden. Es ist aber darauf zu achten, dass nicht zuviel der zu untersuchenden Flüssigkeit verwendet wird, damit eine genügende Alkalinität erhalten bleibt. Besser verwenden wir Karbonat in Substanz. Der Essigsäurezusatz muss dann recht langsam erfolgen, des lebhaften Aufschäumens wegen.

Die Reaktion im Harn mit Karbonatlösung ohne Säurezusatz durch Alkalikarbonat anstellen zu wollen, ist nicht angängig, da die durch Kreatinin erzeugte Rotfärbung nicht verschwindet. Experimentell können wir uns davon überzeugen, wenn wir mit einer wässigeren Kreatininlösung 1/1000 arbeiten. Selbst wenn wir Karbonat in Substanz in grossem Ueberschuss zugeben, entsteht sehr langsame Entfärbung.

Statt Alkalilauge kann man zur Legal'-von Bitto'schen Reaktion auch Ammoniak verwenden, worauf Rothera[9] in seiner „Notiz über die Nitroprussidnatriumreaktion des Acetons" hinweist.

Wir stellen folgende Versuche an:

1. 5 cc Kreatininlösung 1/1000 mit 3—4 Tropfen konzentrierter Lösung von Nitroprussidnatrium und einigen Tropfen 20%igem Ammoniak versetzt, ergeben eine Rotfärbung, die aber in gelb

übergeht. Eine konzentriertere Kreatininlösung, etwa 1/100, ergibt ein etwas längeres Bestehenbleiben, aber sie ist auch nicht haltbar.

2. 5 cc Aceton 1/1000 in gleicher Weise behandelt, ergibt eine Rot-Violettfärbung, die aber nicht sofort, sondern erst nach einigem Zuwarten erscheint. Zehnmal konzentriertere Acetonlösung ergibt sie in kürzerer Zeit.
   Setzen wir Ammoniak im Ueberschuss zu, so verschwindet in beiden Fällen die Rotfärbung, um einer mehr oder weniger intensiven Gelbfärbung Platz zu machen.
3. 5 cc Acetessigsäure 1/1000 ergeben im gleichen Versuch schon auf Zugabe von 2—3 Tropfen Ammoniak ein Verhalten wie Kreatinin, d. h. die Rotfärbung geht rasch in orange und gelb über.

Die mit Aceton (Versuch 2) erhaltene Rotviolettfärbung ist nicht die, welche wir bei der Lange'schen Ringprobe erhalten. Letztere ist permanganatviolett und geht langsam in blau über.

Rothera zeigt ferner, dass wir die permanganat-violette Farbe erhalten, wenn wir nicht nur Ammoniak zusetzen, sondern auch festes Ammoniumsalz. Dieser Zusatz wirkt so, wie wenn Säure zugesetzt worden wäre.

Kreatinin gibt *keine*, Ketone (Aceton, Acetylaceton, Acetophenon) aber *geben* eine Violettfärbung. Die Ketosäuren geben wohl eine rotviolette Färbung, aber nicht das Permanganatviolett. Der Autor gibt an, dass bei den Ketonen noch in einer Konzentration 1/20 000 nach einer halben Stunde die Violettfärbung auftritt.

Nach unseren eigenen Beobachtungen (immer auf Kreatinin, Aceton und Acetessigester beschränkt) kann man die Rothera'sche Reaktion empfindlicher gestalten, wenn man etwas anders verfährt, als der Autor es angab.

Wir stellen folgenden Versuch an:
5 cc Aceton 1/1000 werden mit ca. 0,25 gr Ammoniumsulfat und hierauf mit 3—4 Tropfen einer konzentrierten Nitroprussidnatriumlösung versetzt. Hierauf überschichten wir vorsichtig mit Ammoniak. Es entsteht ein permanganatvioletter Ring, wie

wir ihn von der Lange'schen Reaktion her kennen. Wenn wir nach einigem Zuwarten durchschütteln, so teilt sich die Violettfärbung der Gesamtflüssigkeit mit. Schütteln wir ohne Zuwarten durch, so verschwindet der Ring und auch die Violettfärbung.

Nach einiger Zeit tritt die Violettfärbung der Gesamtmasse wieder auf. Mischen wir von vorneherein durch, so ist die Reaktion sehr wenig empfindlich und tritt verzögert ein.

Wir stellen also die Reaktion am besten als Ringprobe an. Einerseits wird durch das Ueberschichten des Ammoniaks eine genügende Ammoniakkonzentration erreicht, so dass die Reaktion rasch eintritt. Das Gleichgewicht zwischen der farblosen Verbindung und dem violetten Isomeren, das anfänglich noch umkehrbar ist (Verschwinden des Ringes) wird andrerseits rascher verschoben und wird unumkehrbar.

Es ist gleichgültig, ob wir die Acetonlösung zuerst mit Nitroprussid versetzen und nachher mit Ammoniumsalz und dem Ammoniak, oder in oben angegebener Reihenfolge.

Ferner können wir auch das Ammoniumsalz in Ammoniak lösen und damit die mit Nitroprussidnatrium versetzte Lösung unterschichten. Liegt eine höhere Acetonkonzentration als 1/1000 vor, so können wir auch durchmischen, ohne dass die Reaktion verzögert auftritt.

Wie schon oben gesagt, gibt Acetessigsäure (resp. deren Aethylester) keine Violettfärbung, auch nicht, wenn wir die Reaktion als Ringprobe anstellen.

Es ist nun klar, dass die Lange'sche Acetonreaktion prinzipiell nicht verschieden ist von der Rothera'schen. Die Lange'sche Reaktion wird bekanntlich so vorgenommen, dass nach dem Nitroprussidzusatz Essigsäure zugesetzt wird. Es kann (nach Lipp) auch Salzsäure oder verdünnte Salpetersäure genommen werden. Hierauf wird mit Ammoniak überschichtet. Durch die Säuregegenwart entsteht natürlich mit dem Ammoniak ein Ammoniumsalz. Wir haben also neben dem Ammoniak auch Ammoniumsalz, so dass alle Bedingungen für die Rothera'sche Reaktion erfüllt sind.

Man sieht sofort ein, dass der Säurezusatz für die Lange'sche Reaktion eine geringe sein muss, damit Ammoniak im Ueberschuss vorhanden ist. Der Ammoniaküberschuss wird leichter garantiert, wenn wir überschichten. Durch das Ueberschichten bleibt auch das gebildete Ammoniumsalz lokal und recht konzentriert, wodurch eine Farbbildung mit Kreatinin und Acetessigsäure verhindert wird. Wir weisen mit der Lange'schen Probe also nur Aceton, aber nicht Acetessigsäure nach.

Eine einfache Ueberlegung ergibt, dass man die Lange'sche Reaktion auch in anderer Weise durchführen kann, indem man nämlich Ammoniumsalz in Substanz und Nitroprussidnatrium zu der zu untersuchenden Lösung zusetzt und aus ersterem Ammoniak freimacht.

Wir können wie folgt vorgehen:
5 cc Acetonlösung 1/100 werden mit 3—4 Tropfen Nitroprussid-Na-Lösung vesetzt. Dazu geben wir ca. 0,25 festes Ammonsulfat. Es wird nicht durchgeschüttelt, so dass die grösste Menge Sulfat ungelöst bleibt. Wir unterschichten mit Natronlauge, welche dadurch mit dem Ammonsulfat in Berührung kommt. Es entsteht freies Ammoniak. Man kann auch eine Rotula Natrium hydricum hineinbringen. Die Violettfärbung entsteht in der Zone über dem Ammoniumsalz. Diese Modifikation ist nicht sehr empfindlich und geht nicht mehr bei einer Konzentration von 1/1000. Wir führen sie aber an, weil sie als topochemische Reaktion im Sinne Kohlschütters zum Verständnis der Lipp'schen Reaktion überleitet.

Bevor wir auf die Beschreibung letzterer eingehen, wollen wir uns in der Literatur weiter umsehen. Wesentlich anderes, als was wir schon wissen, bringt sie nicht, mit Ausnahme der Publikationen von Zwikker (s.u.) & Lawrence.

Rimini[10] berichtet, in einer Publikation über: „Neue Reaktion des Acetons und neue Methode zur Untersuchung aliphatischer Amine", dass Aceton mit primären Aminen in Gegenwart von Nitroprussidnatrium eine rotviolette Färbung ergibt, die sich in der Farbe von derjenigen des Ringes der Legal'schen Reaktion unterscheidet.

Mit sekundären und tertiären Aminen ensteht eine Orangefärbung. Bei Acetongegenwart kann die Reaktion zur Differenzierung der Amine dienen.

Wir können annehmen, dass das mit primärem Amine erzeugte Kondensationsprodukt identisch ist mit demjenigen, das Rothera mit Ammoniak erhält.

Campi[11] (Ueber Farbreaktionen des Nitroprussidnatriums) weist darauf hin, dass Nitroprussidnatrium mit Aceton und allen Substanzen, die Keto- und Aldehydgruppen neben beweglichem H enthalten und die mit freier oder gebundener salpetriger Säure unter Bildung von Nitroso- oder Isonitrosoderivaten reagieren, Farbereaktionen ergibt. Das mit Aceton erhältliche Kondensationsprodukt ist ein Ferropentacyanisonitrosoketonkomplex.

Zwikker[12] (Beiträge zur Kenntnis der Reaktion von Legal) untersuchte den Chemismus der Legal'schen Reaktion für Aldehyde und Ketone. Er zeigt, dass die entstehenden Kondensationsprodukte polychrome Verbindungen sind. Er sagt, dass nur *höhere* cyklische Oximinoketone polychrom sind, aber *niedere* Polychromie aufweisen, wenn sie sich im Ferropentacyankomplex befinden.

Eine blaue Nitrosoenolform des Ferropentacyanisonitrosoacetonnatriums erhält er durch Anstellen der Lange'schen Reaktion in Gegenwart von *Formamid*. In Wasser entsteht das rote Isomere als inneres komplexes Natriumsalz. Die rote Farbe geht bald in Gelb über unter Bildung des gelben Isomeren. Die Isomeren seien noch nicht analysenrein erhalten worden.

Wir wollen an dieser Stelle einige eigene Beobachtungen beifügen. Es ist leicht nachzuweisen, dass die Verbindung, die bei Gegenwart von Formamid entsteht, die gleiche ist wie diejenige, die wir erhalten, wenn wir Ammoniumsalz beifügen:

Zu 10 cc Acetonlösung geben wir 5—6 Tropfen konzentrierter Nitroprussidnatriumlösung, sowie ca. 0,5 cc Ammoniak. Wir geben je die Hälfte in zwei Reagenzgläser, wovon das eine ca. 0,25 festes Ammoniumsalz enthält, das andere ca. 0,5 cc Formamid. Es entsteht eine absolut indentische Permanganat-Violettfärbung in beiden.

Weiter verhalten sich die beiden Kondensationsprodukte absolut gleich gegenüber von Ferrosalz: es entsteht neben einem braunen Niederschlag eine Braunfärbung der Flüssigkeit.

Wir fragten uns ferner, ob es sich bei der Rothera'schen Reaktion mit Ammoniak oder mit Ammoniak und Ammoniumsalz wirklich um einen *Nitroso*-Komplex handelt. Wir kamen dazu durch die Ueberlegung, dass durch das Beifügen von Ammoniak zur Mischung Acetonlösung + Nitroprussidnatrium das komplexe Cyanid $[Fe(CN)_5 NH_3] Na_3$ entstehen und dass letzteres in Reaktion treten könnte. Bekanntlich erhalten wir (nach Ephraim[13]) letzteres Komplexsalz, wenn wir $[Fe(CN)_5 NO] Na_2$ (Nitroprussidnatrium) mit starkem Ammoniak behandeln. Wir stellten daher folgenden Versuch an:

Wir versetzen Nitroprussidnatrium in Substanz mit 30%igem Ammoniak. Nach längerem Zuwarten hat sich das Komplexsalz ganz aufgelöst und die anfänglich noch rote Farbe hat einer orange-gelben Platz gemacht. Wenn wir nun eine Acetonlösung 1/1000 mit einigen Tropfen dieser Lösung versetzen, so erhalten wir eine Rotviolettfärbung, die sich äusserlich in nichts von derjenigen unterscheidet, die entsteht, wenn wir nach Rothera verfahren in der Reihenfolge: Acetonlösung + Nitroprussid + Ammoniak.

Mit Acetessigsäureaethylester erhalten wir ein analoges Resultat wie nach Rothera.

Wenn wir aber die mit Aceton + $[Fe(CN)_5 NH_3] Na_3$ erzeugte rote Verbindung mit festem Ammoniumsalz versetzen, so entsteht nicht, wie wir erwarteten, eine Permangnat-Violettfärbung wie bei der Legal'schen Probe, sondern nur eine Bordeaux-Rotfärbung. Ein gleiches Resultat entsteht, wenn wir Ammoniumsalz *vor* dem Ammoniumcyankomplexsalz zugeben.

Diese Beobachtungen schliessen nun natürlich nicht aus, dass bei der Rothera'schen Reaktion (ohne Ammoniumsulfat), mit Ammoniak allein kein Nitrosokomplex vorliegt. Das Verhalten beim Hinzufügen von Ammoniumsulfat spricht aber für das Vorliegen eines solchen. Wir werden weiter unten sehen,

dass van Uerk glaubt, dass dem Ammoniumsalz die Rolle zukommt, die Dissoziation des NH_4 OH zu vermindern. Es verhindert offenbar auch die Bildung des Ferropentacyanaminonatriums, so dass der Nitrosokomplex geschützt wird.

Was an weiteren Publikationen erschienen ist, bietet für uns kein, oder geringes Interesse; sie beschränken sich meist auf die Beschreibung von Modifikationen. Wir erwähnen deshalb nur die Titel oder beschränken uns auf kürzeste Angaben.

Fleischmann[14]. Nachweis von Aceton im Harn. Praktische Angaben für die Ausführung der Reaktionen.

Rösler[15] beschreibt eine Modifikation der Lange'schen Reaktion.

Trenkel[16] gibt Details über die Ausführung der Lange'schen Reaktion.

Borisch[17] beschreibt ebenfalls genauer den Ausführungsmodus der Lange'schen Reaktion.

Adler[18]. Ein Acetonurometer. Er beschreibt eine quantitative Methode, gestützt auf die Nitroprussidnatriumreaktion und gibt eine Farbtabelle an.

Schael[19] „Eine quantitative Methode der Aceton und Acetessigsäurebestimmung mit dem Autenrieth'schen Colorimeter".

Wagenaar[20] „Nachweis von Aceton im Harn". Für die Lange'sche Probe könne statt Eisessig Weinsäure verwendet werden.

Bigwood & Ladd[21] (Die qualitativen Proben für Acetonkörper; ihre Bedeutung und ihr Wert) geben Angaben über die verschiedenen Ausführungsweisen mit Nitroprussidnatrium und Eisenchlorid.

Van Uerk[22] (Das Verhalten verschiedener Ammoniumsalze bei der Reaktion von Rothera). Der Autor gibt an, dass sich das Ammoniumsulfat am besten eigne, da unter seiner Verwendung die Reaktion am empfindlichsten wird. Die Gegenwart des Ammoniumsalzes sei notwendig zur Herabsetzung der Dissoziation des NH_4 OH.

R. D. Lawrence[23] beschreibt eine Modifikation der Rothera'schen Reaktion. Man könnte sie als „Halbtrockenreaktion" bezeichnen, indem er den einen Teil der Reagenzien in trockener Form verwendet. Zu einem halben Reagensglas Harn gibt er 2 cc einer Mischung von festem Ammoniumsulfat und festem gepulvertem Nitroprussidnatrium (20 Teile Sulfat und 1 Teil Nitroprussiat). Hierauf fügt er 2 cc Ammoniak hinzu, schüttelt durch und lässt absetzen. Es entsteht die permanganatähnliche Violettfärbung.

Lawrence meint, dass er mit seiner Modifikation nicht nur Aceton, sondern auch Acetessigsäure nachweist. Dass letzteres nicht der Fall ist, kann man leicht mit einer Acetessigätherlösung beweisen. Mit einer solchen allein erhalten wir keine violette Färbung, sondern eine gelbe, oder bei stärkerer Konzentration eine orange, wie dies auch der Fall ist für das Lipp'sche oder unser Trockenreagens.

Nach Vorstehendem verstehen wir nun sofort, wie ein Trockenreagens auf Aceton beschaffen sein muss.

Wir sahen, dass die Alkalilauge in der Legal'schen Reaktion durch Karbonat ersetzt werden kann. Ferner, dass es nicht notwendig ist, für die Lange'sche Reaktion Ammoniak zuzufügen, sondern dass es möglich ist, die Reaktion zu erhalten, wenn wir das Ammoniak an Ort und Stelle erzeugen.

Was das Lipp'sche Reagens betrifft, können wir keine genauen Angaben über die Zusammensetzung machen, indem je nach der Herkunft dieselbe beträchtlich schwankt, vielleicht auch wegen ungenügender Stabilität. Besonders wenig haltbar war ein Reagens, das durch das Urocit-Laboratorium in Olten als Acetocit in den Handel gebracht wurde. Immer enthalten die Reagenzien neben gepulvertem Nitroprussidnatrium ein Ammoniumsalz und ein Alkalikarbonat.

Wir haben uns nicht der Mühe unterzogen die verschiedenen Reagenzien, die oft stark nach Ammoniak riechen und daher nicht stabil sein können, zu untersuchen, sondern wir haben verschiedene eigene Formeln auf ihre Empfindlichkeit geprüft.

Die beste Zusammensetzung ist folgende:

Nitroprussidnatrium	1,10 g
Ammoniumsulfat	5,0 g
Natriumkarbonat	10,0 g

Ersteres soll gepulvert und durch ein Sieb passiert sein. Das Ammoniumsulfat, sowohl als auch das Natriumkarbonat müssen wasserfrei sein. Am besten verwenden wir Karbonat pro analysi, das granuliert und wenig hygroskopisch ist. Da es zudem relativ wenig löslich ist, bleibt es als Bodensatz lange bestehen, so dass die Reaktion als typisch topochemische vorgeht.

Es sind eine ganze Anzahl von Modifikationen möglich. So können wir das $(NH_4)_2\ SO_4$ durch das Chlorid, das Karbonat oder das Nitrat ersetzen. Letzteres hat Rothera für seine Reaktion als unbrauchbar bezeichnet. Für ein Trockenreagens können wir es aber wohl gebrauchen. Nicht brauchbar ist, wie auch Rothera sagt, das Oxalat. Das gleiche gilt für andere organische Ammoniumsalze.

Wir sahen oben, dass statt Ammoniumsalz Formamid verwendbar ist. Wir können letzteres durch ein geeignetes Silikat adsorbieren lassen. Ein solches ist z. B. das Levilit (Société Fir, Lausanne). Dieses leichte Pulver kann eine beträchtliche Menge Formamid, das bekanntlich bei 18° flüssig ist, aufnehmen. Wenn wir trocknen lassen, so wird das Pulver mit Nitroprussidnatrium und Natriumkarbonat unzersetzt mischbar.

Auch können wir Natriumkarbonat durch Kaliumkarbonat ersetzen. In diesem Falle müssen wir ein adsorbierendes Silikat (siehe oben) beifügen, um einen genügenden Bodensatz zu erhalten, worin die topochemische Reaktion stattfinden kann. Man kann natürlich auch gepulvertes Natriumhydrat verwenden, das wir erst im Moment der Verwendung zu einem zweiten Pulver, bestehend aus dem Nitroprussidnatrium und Ammoniumsalz, beifügen. In dieser Weise geht Teufl, Wien, vor. Die Reaktion wird auf einem Wattebausch durch Beifügen einiger Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit vorgenommen. Auch hier wird durch Adsorption in der Watte die Reaktion zu einer topochemischen.

Andere Alkali-Salze (statt Karbonat) sind nicht verwendbar. Wir erhielten negative Resultate mit tribasichem Natriumphosphat, Alkali-Citrat und -Oxalat (s. o.).

Die von uns adoptierte Technik zur Ausführung der Reaktion ist folgende:

Wir verwenden kleine Reagenzgläser von 1 cm Durchmesser und ca. 4 cm Länge. Man beschickt ein solches mit Reagenzpulver etwa 4 mm hoch. Darauf geben wir etwa 1 cc der zu untersuchenden Flüssigkeit. Es darf nicht durchgemischt werden, da sonst die Reaktion bedeutend verzögert oder bei geringer Acetonkonzentration ganz verhindert wird. Die Reaktion muss ganz im Innern der festen Masse beginnen, damit eine genügende Massenwirkung stattfindet. Bei Verwendung einer recht verdünnten Acetonlösung können wir sehr schön verfolgen, wie die Violettfärbung um die einzelnen Nitroprussidpartikelchen herum beginnt. Es bilden sich Reaktionsnester, die sich langsam auf die ganze Masse ausdehnen. Es ist unschwer, sich vorzustellen, was vorgeht. Einerseits wird Ammoniak entwickelt, das sofort mit Aceton und Nitroprussid in Reaktion tritt. Andererseits ist natürlich der notwendige Ueberschuss von Ammoniumsalz vorhanden. Es scheint auch, dass das Nitroprussiat katalytisch die Ammoniakbildung begünstigt.

Wie präsentiert sich nun die positive Acetonreaktion? Wir beschreiben sie zuerst für eine Acetonlösung mittlerer Konzentration, etwa 1/1000. In kurzer Zeit entsteht eine Violettfärbung im Bodenpulver. Bei einigem Zuwarten teilt sich die Färbung ringförmig auch der Flüssigkeit mit, während das Pulver immer dunkler gefärbt wird, um schliesslich blau zu werden. In acetonhaltigem Harn verläuft die Reaktion nicht anders.

Liegen höhere Konzentrationen vor, so verläuft die Reaktion viel rascher. Die ganze Flüssigkeit wird violett, der Bodensatz rasch dunkelblau und endlich auch die Flüssigkeit.

Geringe Konzentration (1/10 000) erfordert ein Zuwarten von 5—10 Minuten. Die Violettfärbung wird aber noch sehr deutlich; auch bleibt sie länger erhalten, ohne in blau überzugehen. Eine

Konzentration von 1/20000 ist noch deutlich erkennbar. Noch geringere Konzentration gibt eine schmutzige *grünliche* Färbung des Bodensatzes.

Gewöhnliches Wasser gibt mit dem Reagens eine flüchtige Rosafärbung der überstehenden Flüssigkeit, dem Nitroprussid-Natrium zuzuschreiben. Der Bodensatz bleibt erst farblos und wird nach und nach gelblichbraun. Acetonfreie, schwach gefärbte Harne ergeben einen etwas brauneren Bodensatz, niemals einen grünen, violetten oder blauen. Stärker pigmentierte, acetonfreie geben durch Adsorption der Farbstoffe oft einen schmutzig braunen Bodensatz.

Verwenden wir statt des Reagens mit Ammoniumsalz ein solches mit adsorbiertem Formamid, so sind die Reaktionen analog. Die Empfindlichkeit ist aber eine etwa zehnmal geringere.

Was geschieht, wenn neben Aceton auch Acetessigsäure vorhanden ist? Um diese Frage zu beantworten, müssen wir zuerst untersuchen, was wir erhalten, wenn wir eine wässerige Acetessigsäureaethylesterlösung verwenden. Wir sahen oben, dass die Rothera'sche Reaktion mit Ammoniak und Ammoniumsalz oder die Lange'sche Reaktion keine Violettfärbung, sondern eine gelbliche ergibt. Mit unseren festen Reagenzien erhalten wir schon für 1/10000 eine gelb-orange Färbung. Höhere Konzentrationen ergeben eine Orangefärbung.

Untersuchen wir ein Gemisch von Aceton und Acetessigester, so entsteht erst die Orangefärbung. Im Pulver aber überwiegt recht rasch die durch Aceton erzeugte Dunkelfärbung. Es resultiert schliesslich eine schmutzige Grünfärbung, als Mischton.

In Harn, der beide Ketonkörper enthält, entsteht auch, statt einer Violett- und Blaufärbung, diese schmutzige Grünfärbung. Wenn beide Ketonkörper in geringer Konzentration vorhanden sind, erhalten wir eine wenig intensive Grünfärbung des Bodensatzes. Wir sahen vorhin, dass auch Spuren Aceton allein eine solche ergeben. Tritt die Grünfärbung auf, so muss daher mit dem Acetessigsäurereagens geprüft werden, ob letzterer Ketonkörper vorhanden ist.

Was die Fehlerquellen unserer Acetonreaktion betrifft, können wir sagen, dass wir solche nicht aufgefunden haben. Weder Aethylalkohol, noch Aldehyde ergeben, im Gegensatz zur Legal'schen Reaktion, die diese nachweist, eine positive Reaktion. Andere pathologische Harnbestandteile scheinen nie eine positive Reaktion vorzutäuschen. Wie gesagt, stören manchmal stark pigmentierte Harne die Reaktion. Entfärbung mit tierischer Kohle oder Aussalzen der Farbstoffe mit Ammoniumsulfat erlauben die Ausschaltung dieser Störungen.

Ausscheidungsprodukte von Medikamenten geben nach unseren Erfahrungen keine Reaktionen, die man mit der Acetonreaktion verwechseln könnte. Einige Barbitursäurederivate (z. B. Allonal) ergeben nach *längerer Zeit* eine Braunschwarzfärbung.

Ueberhaupt muss noch auf die Spätreaktion hingewiesen werden. Acetonhaltige Harne geben eine schwarzblaue Färbung der ganzen Masse, wenn wir 24 Stunden zuwarten. Auch normale Harne können nach dieser Zeit eine Blaufärbung (Turnbulls Blau?) aufweisen. Da unsere Reaktion eine Schnellreaktion ist, haben wir uns nicht näher mit der Natur dieser Spätreaktion beschäftigt. Man muss nur wissen, dass diese Spätfärbung für Aceton nicht typisch ist.

Endlich wollen wir nebenbei erwähnen, dass unser Acetonreagens zum Nachweis von freier schwefliger Säure oder von Substanzen, die diese abspalten, verwendet werden kann. Wir haben diese Reaktion zufällig entdeckt. Es entsteht nicht eine Violett- sondern eine Rosarotfärbung, zuerst des Bodenpulvers und nachher der überstehenden Flüssigkeit; allerdings blassen die Färbungen in ziemlich kurzer Zeit nach einem Maximum wieder ab.

Wir kommen nun nochmals auf die Natur der permanganatvioletten Pentacyanisonitrosoketonkomplexes zurück. Man könnte annehmen, dass das violette Isomere überhaupt nicht eine besondere Verbindung darstellt, sondern dass die Violettfärbung eine Mischung der Rotfärbung des roten Isomeren mit einer kolloidalen Lösung von Turnbulls Blau ist. Wir haben eine Anzahl von Versuchen angestellt.

1. Dekantieren oder filtrieren wir die violette Lösung vom Bodenpulver ab und überlassen die Flüssigkeit in einem Reagenzglas sich selber, so blasst die Färbung in kürzerer oder längerer Zeit (je nach Konzentration) *ganz* ab, und es bleibt eine milchige Trübung. Dies ist auch der Fall, wenn noch freies Aceton vorhanden ist. Zufügen von etwas Ammoniak erzeugt wieder eine Violettfärbung geringer Intensität.
2. Viel rascher findet die Entfärbung statt, wenn wir die Lösung in eine Petrischale ausgiessen und verdunsten lassen. Es bleibt ein gelbbraunes Residuum.
3. Wenn wir die violette Lösung leicht erwärmen, so findet die Entfärbung vor Erreichen der Siedetemperatur und vor dem Verschwinden des Acetons statt (wovon wir uns überzeugen können, wenn wir das Aceton an der Mündung des Reagenzglases anzünden). Durch Hinzufügen von etwas Ammoniak ist die Reaktion teilweise umkehrbar, wie unter 1.
4. Belassen wir den Reagenz-Bodensatz mit der violetten Lösung und erwärmen, so findet ebenfalls Entfärbung statt. Erwärmten wir nur sehr leicht, so tritt die Violettfärbung von selbst wieder auf.

Ein anderes Verhalten beobachten wir, wenn wir die roten Isomeren, wie wir sie bei der Legal-v. Bitto'schen Reaktion erhalten, erwärmen. Wir machten folgende Versuche:

1. 5 cc Acetonlösung 1/1000 mit 3—4 Tropfen Nitroprussidnatriumlösung + NaOH ergibt die bekannte Rotfärbung. Erwärmen wir leicht, so verschwindet die Rotfärbung und es entsteht ein brauner Niederschlag. Fügen wir nun Essigsäure hinzu, so entsteht eine Blau-Grünfärbung von Turnbulls (oder Berliner-) Blau. Bekanntlich zeigt diese Hexacyankomplexverbindung ein typisches Verhalten: die Blaufärbung verschwindet auf Laugenzusatz, erscheint aber wieder auf Säurezusatz. Dies ist der Fall für unsere Blaugrünfärbung, die auf Laugenzusatz wieder verschwindet.
2. Wir behandeln 5 cc Acetessigsäureaethylester 1/1000 in gleicher Weise. Der nach dem Erwärmen entstandene Niederschlag gibt auf Säurezusatz Turnbulls Blau.

3. 5 cc Kreatininlösung 1/1000 in gleicher Weise behandelt ergibt beim Erwärmen eine Orangefärbung. Auf Säurezusatz entsteht keine Blaufärbung.

Aus diesen Versuchen ergibt sich folgendes:

1. Die violette Verbindung, welche die Lange'sche und die Lipp'sche Reaktion mit Aceton erzeugt, ist sehr unstabil. Es ist nicht möglich, sie in fester Form zu erhalten.
2. Die Kondensationsprodukte, welche die Legal'sche Reaktion mit Aceton und Acetessigsäure ergeben, wandeln sich beim Erwärmen und Ansäuern in Turnbulls Blau, einem Cyankomplex mit zweiwertigem und dreiwertigem Eisen, um. Das mit Kreatinin erhaltene rote Kondensationsprodukt ist verschiedener Natur.

Wir haben noch auf andere Weise als durch Eindampfen versucht, das violette Kondensationsprodukt fest zu erhalten. Wir haben dazu folgenden Versuch angestellt:

Wird eine grössere Menge unseres pulverförmigen Reagens in einer Petri-Schale etwa 5 mm hoch ausgebreitet, ohne dass das Pulver jedoch den Rand berührt, und im Zentrum eine Delle gemacht, in welcher wir einige cc einer Acetonlösung 1/1000 geben, so wird die Lösung in kurzer Zeit durch das Reagens ganz verschluckt. Vom Zentrum ausgehend entsteht die Violettfärbung, die sich langsam konzentrisch nach dem Rande ausdehnt. Lassen wir an der Luft trocknen, so erhalten wir einen festen Kuchen, dessen zentrale Partien gelbbraun und dessen periphere blau sind. Wenn wir vom Rande einige reinblaue Partien ausbrechen und sie in Wasser auflösen, so erhalten wir eine blaue, offenbar kolloidale Lösung, die wir auch durch Filtrieren nicht klar erhalten können. Diese Lösung ist weder Berliner- noch Turnbulls Blau, indem sie nicht das oben beschriebene typische Verhalten dieser Verbindungen zeigt.

Es ergibt sich daraus, dass die violette Färbung wohl auf eine Mischung zweier Verbindungen, einer roten und einer blauen, zurückgeführt werden könnte. Die letztere ist aber nicht Turnbulls oder Berliner Blau. Es ist wahrscheinlicher, dass die violette Verbindung ein Isomeres der roten darstellt, während die blaue kein solches mehr ist.

Acetessigsäurenachweis

Bevor wir uns mit der Beschreibung unserer neuen Reaktion auf Acetessigsäure befassen, müssen wir einige Betrachtungen über den Acetessigsäure-Aethylester vorausschicken. Letztere Verbindung diente uns dazu, unsere Reaktion zu studieren.

Die Acetessigsäure $CH_3-CO-CH_2-COOH$ ist frei nicht im Handel, sondern nur ihr Aethylester $CH_3-CO-CH_2-COO-C_2H_5$, den man auch kurzweg als Acetessigester bezeichnet.

Wenn wir von diesem 0,1 cc zu Wasser von Zimmertemperatur (10 cc) geben, so breitet er sich anfänglich auf der Oberfläche aus. Erschüttern wir das Reagenzglas etwas, so sinkt der Ester in Tröpfchen durch das Wasser auf den Boden. Schütteln wir durch, so verteilt er sich in feine Tröpfchen, die, je nach Grösse, mehr oder weniger lang in Suspension bleiben. Warten wir einige Zeit zu, so gehen sie vollständig in Lösung. Dieses Verhalten ist darauf zurückzuführen, dass der Acetessigester in zwei tautomeren Modifikationen vorkommt. Der käufliche Ester ist ein allelotropes Gemisch. Bei gewöhnlicher Temperatur sind darin 7,4—8 % Enol: $CH_3-C(OH)=CH-CO_2-C_2H_5$. Der Rest ist Ketoform: $CH_3-CO-CH_2-CO_2-C_2H_5$ (Karrer[24]). In Wasser von 0° sind nur 0,5 % Enol löslich, jedoch 11 % der Ketoform. Der Rest ist unlöslich. Die Tröpfchen, die bei unserem obigen Versuch bei Zimmertemperatur nicht in Lösung gingen, sind Enol. Wenn sie nach Zuwarten in Lösung gegangen sind, bedeutet dies, dass das Enol in Keton übergegangen ist.

Versetzen wir einige cc einer Lösung, die keine Tröpfchen mehr in Suspension enthält, mit einigen Tropfen einer Ferrichloridlösung, so entsteht die bekannte Burgunderfärbung der Gerhardt'schen Reaktion. Letztere erreicht ihre ganze Intensität nicht sofort, sondern erst nach einigem Zuwarten. Diese Erscheinung ist wieder im Zusammenhang mit der Tautomerie. Nur das Enol gibt nämlich mit Ferrichlorid eine intensive Färbung, während die Ketoverbindung farblos bleibt (Hollemann[25]). Sahli[26] weist in seinem Lehrbuch der klin. Untersuchungsmethoden ebenfalls auf diesen Punkt hin. In obigem Versuch ist die sofortige Rotfärbung durch das Enol erzeugt. Beim

Zuwarten wird, nach dem Versetzen mit Ferrichlorid, alles Keton, oder ein Teil davon, enolisiert und beteiligt sich nach und nach an der Färbung. Aus diesem Grunde nimmt sie langsam an Intensität zu.

Wir wollen uns nun schon hier fragen, in welcher Form im acidotischen Harn die Acetessigsäure (resp. deren Salze), vorliegen. Beide Formen sind meist nebeneinander vorhanden. Die prozentuale Verteilung hängt wohl in erster Linie vom p_H des Harnes ab. Ist nur sehr wenig Acetessigsäure vorhanden, so scheint fast ausschliesslich die Ketoform vorzuliegen. In solchem Harn pflegt die geringe restliche Menge ganz in Aceton überzugehen. Wenn wir seine Reaktion bestimmen, so werden wir diese stets sauer finden. Andrerseits sehen wir, dass Harne, die beim Aufbewahren lange Zeit die Acetessigsäure behalten, alkalisch sind. Wollen wir daher bei einem sauren Harn die Umwandlung in Aceton bremsen, so brauchen wir ihn nur zu alkalinisieren. Dieses Verhalten ist nicht verwunderlich, da wir wissen, dass Alkali enolisierend wirkt. Andrerseits wissen wir, dass nur die Ketoform in Aceton übergehen kann. Es ist wichtig, sich daran zu erinnern, um nicht gelegentlich klinischen Trugschlüssen zu erliegen. Eine Behauptung, wie die von Lawrence[27]: „Eine positive Reaktion mit Ferrichlorid ist ein Zeichen schwerer Acidose, die eine sofortige Behandlung erfordert" ist nur bedingt richtig, nämlich nur, wenn in stark saurem Harn eine stark positive Reaktion auftritt. Wie wir schon in der Einleitung sagten, darf man zudem nicht, zur Beurteilung des Grades der Acidose, die Untersuchung auf β-Oxybuttersäure unterlassen.

Obige Annahme, dass das Ferrichlorid enolisierend wirkt, kann man noch auf andere Weise sehr schön beweisen, wenn man von einem schwach sauren Harn ausgeht, dessen sofortige Färbung mit Eisenchlorid schwach ausfällt, um nachher an Intensität zuzunehmen. Geben wir von einem solchen gleiche Volumina in zwei alkalifreie Reagenzgläser und versetzen die eine Probe mit schwacher Natronlauge (1—2 Tropfen einer NaOH n/100 auf 10 cc Harn) wobei die Reaktion nicht einmal basisch geworden zu sein braucht, so sehen wir nach einem Zuwarten

von 10—20 Minuten, dass die sofortige Rotfärbung intensiver ausfällt in der behandelten Probe als bei der nichtbehandelten. Etwaiges Ausfallen von Eisenhydroxyd ändert daran nichts. Die Spätfärbung aber erreicht in beiden Proben gleiche Intensität, indem auch in der nichtbehandelten Probe die Enolisierung und damit die Rotfärbung gleichen Wert erreicht. Es ist bei diesem Versuch natürlich darauf zu achten, dass man nicht zu lange zuwartet, damit nicht im unbehandelten Harn die Acetonbildung stark zugenommen hat, wovon man sich natürlich leicht mit dem Acetonreagens überzeugen kann.

Man kann obigen Versuch ebenfalls mit einer Acetessigätherlösung 1/1000 anstellen. Ebenso, indem man gleiche Mengen Harn oder obiger Lösung einmal in einem alkalifreien, die andere Menge in einem gewöhnlichen, nicht alkalifreien Reagenzglas aufbewahrt. Das Alkali letzteren Glases genügt, die Enolisierung hervorzurufen, so dass die primäre Eisenchloridreaktion intensiver ausfällt.

Wir werden weiter unten sehen, dass wir mit unserer neuen Reaktion, sowohl wenn man sie auf „nassem“ Wege anstellt als mit unserem Trockenreagens, ebenfalls, wie mit Ferrichlorid, das Enol erfassen.

Für erstere können wir auf verschiedene Weise vorgehen. Wir beschreiben sie vorerst für eine Acetessigätherlösung 1/1000. Wir mischen 2 cc 10%iger Natronlauge mit ca. 1 cc 5%iger Ferricyankaliumlösung und geben zu dieser Mischung ein gleiches Volumen der zu untersuchenden Lösung. Die gelb gefärbte Lösung geht sofort in Smaragdgrün über. Rasch nimmt die Grünfärbung an Intensität zu, dunkelt nach und wird nach kurzer Zeit braun. Nehmen wir eine schwächere Acetessigätherlösung, oder verwenden wir weniger Ferricyankalium, so resultiert eine mehr gelbliche Endfärbung.

Besonders schön erhält man die Reaktion, wenn man 2,5 cc Acetessigätherlösung mit 20 Tropfen (ca. 1 cc) Ferricyankaliumlösung versetzt und diese Mischung mit Natronlauge unterschichtet. Es entsteht ein grüner Ring an der Berührungsstelle. Die darüberstehende Flüssigkeit wird langsam auch grün.

Schliesslich wird der Ring braun und langsam auch die überstehende Flüssigkeit. Schütteln wir gleich nach dem Entstehen des Ringes das Reagenzglas durch, so tritt die Braunfärbung sofort auf. Wenn man die Reaktion als Ringprobe anstellt, so ist es möglich, Konzentrationen von 1/10000 noch deutlich zu erfassen. Die Gerhardt'sche Reaktion, die schon bei einer Lösung von 1/1000 nicht mehr deutlich und erst nach Zuwarten positiv ausfällt, ist bei jener Konzentration nicht mehr positiv.

Nicht anders verläuft die Reaktion in acetessigsäurehaltigem Harn. Wenn man die Reaktion durch Unterschichten mit Natronlauge anstellt, so können wir noch 1/5000 sehr deutlich nachweisen. Wenn wir einen Harn untersuchen, der keine deutlich positive Reaktion mehr gibt, dessen Gerhardt'sche Reaktion erst deutlich wird bei einigem Zuwarten nach dem Eisenchloridzusatz, so können wir eine deutlichere Reaktion erhalten, wenn wir vorher enolisieren, indem wir einige Zeit vor Anstellen der Reaktion schwach alkalinisieren. Dieses Vorgehen ist weniger wichtig beim „nassen" Verfahren, bei welchem durch die starke Natronlauge eine sofortige Enolisierung zu erwarten ist, als bei Verwendung des Trockenreagens.

Wir haben in einer grossen Reihe von Versuchen die Versuchsbedingungen variiert. Es würde viel zu weit führen, die Versuchsprotokolle anzuführen, da die Ergebnisse in einigen Sätzen resümiert werden können. Wir führen nur die wesentlichen an.

Es war uns in erster Linie daran gelegen, die grüne Verbindung möglichst lange zu erhalten, um festzustellen, welcher Art sie ist. Wir haben schon oben gesehen, dass bei der Ringreaktion die Braunfärbung rasch auftritt, wenn wir durchschütteln. Daraus ergibt sich, dass das Erhaltenbleiben der Grünfärbung von einer nicht zu starken Alkalinität abhängt. Wir haben daher gesucht, dieselbe zu ermitteln. Wenn wir mit einer Acetessigätherlösung 1/1000 arbeiten, davon 2,5 cc mit 20 Tropfen 5%iger Ferricyankalium-Lösung und mit schwacher Lauge vorsichtig versetzen, so konstatieren wir, dass die grüne Färbung mehrere Minuten bestehen bleibt, wenn

p_H der Mischung bei 10,3—10,5 liegt. Es sei hier angeführt, dass die Mischung Acetessigäther-Ferricyankali schwach sauer ist, p_H ca. 6,8.

Zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration bedienten wir uns der Indikatorpapiere nach Dr E. Müller, herausgegeben von der Firma *Bayer*, die uns von letzterer in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt wurden. Diese Methode hat den Vorteil, dass keine Indikatorlösungen verwendet werden müssen und man daher mit geringer Flüssigkeitsmenge auskommt.

Statt Alkalilauge haben wir, unter Beibehaltung obiger Volumina Lösung und Ferricyankalium, Alkalisalze verwendet. So zuerst Natriumkarbonat, Kaliumkarbonat, Bikarbonate, tribasisches Natriumphosphat, Ammoniak. Dabei haben wir immer gesehen, dass die Grünfärbung am längsten bleibt, wenn wir auf 10,3—10,5 alkalinisierten. Am längsten bleibt die Grünfärbung bestehen, wenn wir mit ca. 2%iger Ammoniaklösung alkalinisieren.

Wir wollten zunächst sehen, ob wir durch Eindampfen die grüne Lösung konzentrieren konnten. Schon bei gelindem Erwärmen, lange bevor die Acetessigsäure verdampfen kann, nimmt die Grünfärbung an Intensität sehr rasch zu und wir erhalten sofort die braune Modifikation. Dies tritt in gleicher Weise ein, ob wir Alkalilauge oder Alkalisalze verwenden.

Wir untersuchten die braune Lösung weiter. Hatten wir Natronlauge zur Alkalinisierung verwendet, so bleibt das p_H auch nach Auftreten der Braunfärbung bei 10,3. Säuern wir nun die Lösung mit verdünnter Salzsäure vorsichtig an, so sehen wir, dass die Braunfärbung an Intensität abnimmt und dass wir eine Blaufärbung erhalten, wenn die Wasserstoffionenkonzentration ca. 1,0 erreicht hat. Eine 2-Normalsalzsäurelösung eignet sich am besten dazu. Man muss langsam vorgehen, damit nicht eine starke Erwärmung stattfindet. Alkalinisieren wir statt mit Lauge mit Alkalisalzen oder Ammoniak, so erhalten wir diese Blaufärbung nicht.

Welcher Art ist nun diese Blaufärbung? Ohne Zweifel handelt es sich um eine Pseudolösung von Berlinerblau, denn wenn wir wieder mit Lauge alkalisieren, so verschwindet die blaue

Färbung. Säuern wir wieder an, so tritt sie wieder auf. Dieses Verhalten ist bekanntlich typisch für Berlinerblau. Überlassen wir zudem die saure blaue Lösung sich selbst, so tritt nach mehreren Stunden ein blauer Niederschlag von Berlinerblau auf, und die abfiltrierte Lösung bleibt farblos. Es besteht also kein Zweifel, dass die braune Lösung eine Modifikation von Berlinerblau, schematisch (nach Ephraim) $[\overset{II}{Fe}(CN)_6]\overset{III}{Fe}K$, oder Turnbulls Blau $[\overset{III}{Fe}(CN)_6)\overset{II}{Fe}K$ ist, wenigstens, wenn wir mit Natronlauge alkalinisierten. Eine Kuppelung der Acetessigsäure an den Komplex scheint also nicht mehr vorzuliegen.

Wir mussten uns nun fragen, ob nicht schon die initiale Grünfärbung der positiven Acetessigsäurereaktion auf Berliner- oder Turnbulls Blau zurückzuführen sein könnte, d. h. ob es sich nicht einfach um eine nicht spezifische Reduktion eines Teiles des Ferricyankaliums nicht nur zu Ferrocyan sondern zu $Fe^{\cdot\cdot}$ handelt, wobei letzteres Ion mit dem Ferricyankomplex in Reaktion tritt. Dass Ferrocyankalium entsteht, kann man leicht nachweisen. Wir erhalten auf Zusatz von Ferrichlorid sowohl solange noch die Grünfärbung besteht, als auch wenn sie in braun umgeschlagen hat, Berlinerblau. Daneben scheint aber die grüne Lösung ein Kuppelungsprodukt der Acetessigsäure zu sein. Wir wissen zwar, worauf besonders Ephraim (ibidem) hinweist, dass bei der Berlinerblaubildung anstelle der blauen Fällung oft eine grüne Färbung entsteht, besonders wenn mit recht verdünnten Lösungen gearbeitet wird. Die nachstehend beschriebenen Versuche beweisen aber deutlich, dass es sich nicht um Berlinerblau handeln kann. Erwähnen wir noch vorgängig, dass man mit einer Mischung von Lösungen von Ferri- und Ferrocyankali allein unter Zusatz von Alkali ($p_H = 10{,}3$) natürlich keine Färbung erhält. Ferner, dass wir mit anderen Reduktoren als Acetessigsäure bei dieser Wasserstoffionenkonzentration keine Grünfärbungen erhalten konnten.

Wir stellten, wie oben, folgenden Versuch an:

Acetessigätherlösung 1/1000 versetzten wir mit 15 Tropfen Natriumkarbonatlösung. Es resultiert ein p_H von 10,3. Nach Auftreten einer sehr deutlichen Grünfärbung setzten wir vor-

sichtig n/5 Salzsäure zu. Die Grünfärbung verschwindet und zwar bei einem p_H von 7,0—6,8. Setzen wir wieder Karbonat zu, so erscheint die grüne Färbung wieder, wenn $p_H = 10{,}3$ wieder erreicht ist. Unter etwas abgeänderten Bedingungen, unter Verwendung von 5 cc Diacetäther gleicher Konzentration, gleicher Menge Ferricyankalium und 16 Tropfen Karbonat (5%) erhält man $p_H = 10{,}3$. Säuern wir an, so tritt Entfärbung bereits in alkalischem Milieu, bei $p_H = 8{,}0$ ein. Karbonatzusatz lässt wieder Grün erscheinen.

Analoge Resultate erhielten wir, wenn wir statt Karbonat Lauge verwendeten, ferner Ammoniak oder tribasisches Natriumphosphat. Immer trat nach schwachem Ansäuern, oder schon bei Neutralität, Verschwinden des Grüns auf und Wiederauftreten beim Alkalinisieren. Man kann auch bedeutend mehr Säure, im Ueberschuss zusetzen, ohne dass die Resultate anders werden. Ebenfalls kann man Alkali im Ueberschuss zugeben. Solange die braune Färbung, die ja in diesem Falle besonders rasch auftritt, noch nicht vorherrscht, entfärbt Säurezusatz. Ist die Braunfärbung aufgetreten, so erzeugt, vergleiche oben, starker Säureüberschuss Berlinerblau.

Wir sehen aus obigen Versuchen, dass das grüne Produkt sich nicht wie Berliner- oder Turnbulls Blau verhält, sondern gerade umgekehrt. Letzteres ist im basischen Gebiet farblos und blau im sauren, ersteres grün im basischen, farblos im sauren.

Weitere Versuche zeigen noch deutlicher, dass nicht Berlinerblau vorliegen kann. Unser grünes Produkt kann nämlich reduziert werden. Wir verwendeten dazu eine konzentrierte Lösung von l-Ascorbinsäure, oder letztere in Substanz. Es tritt eine vollständige Entfärbung ein, die nicht etwa auf Ansäuern zurückzuführen ist, da wir bei alkalischer Reaktion von ca. 10,3 arbeiteten. Eine Berlinerblaulösung lässt sich nicht durch Ascorbinsäure reduzieren. Das Reduktionsprodukt enthält Ferrocyankalium; mit Ferrichlorid resultiert Berlinerblau. Wiederoxydation des Reduktionsproduktes mit Persalz oder Brom, die wir versuchten, erzeugt keine Grünfärbung, sondern nur eine Gelbfärbung, typisch für Ferricyankalium.

Es ist eine Besonderheit der Acetessigsäure-Reaktion, dass wir sie nicht erhalten, wenn wir Ferrocyankalium, Alkali plus ein Oxydationsmittel verwenden, bei Innehaltung der nötigen Basizität für unsere Reaktion, natürlich. Dieses Verhalten ist einigermassen erstaunlich.

Eine Entscheidung, welches die Zusammensetzung des grünen Produktes ist, können wir nicht fällen. Keinesfalls handelt es sich um Berliner- oder Turnbulls Blau. Es scheint sich vielmehr um ein Kondensationsprodukt zu handeln, bei dem die Acetessigsäure an den Ferri-(Ferro?)-cyankomplex angelagert ist.

Wir müssen hier nun beschreiben, was mit einer wässerigen Acetonlösung allein geschieht. Wenn wir in beschriebener Weise die Ringprobe anstellen, so erhalten wir mit 1/1000 einen ganz langsam entstehenden, schwach braun gefärbten Ring. Höhere Konzentrationen, etwa 1/100, geben einen viel intensiver gefärbten Ring. Es fehlt aber, in beiden Fällen, die primäre Grünfärbung des Ringes. Ebenso wird die überstehende Flüssigkeit niemals grün. Daraus ergibt sich, dass bei Harn, der Acetessigsäure (und natürlich zugleich auch Aceton) enthält, der braune Ring, wenn er sofort auftritt, auf beträchtlichen Acetongehalt schliessen lässt. Schütteln wir, bei obiger Ringprobe mit Acetonlösung durch, so entsteht bei der schwächeren Konzentration eine schwache Gelbbraunfärbung, bei der 10mal stärkeren eine intensivere, mehr braune Lösung, aber niemals vorgehend eine grüne. Die grüne Phase ist also nur für Acetessigsäure typisch. Wir werden weiter unten auf den Unterschied zwischen der „nassen“ Ringprobe und derjenigen mit dem Trockenreagens gegenüber Aceton hinweisen.

Mit einer Lösung von β-Oxybuttersäure erhalten wir beim Ausführen der Ringprobe bei einer Konzentration von 1/100 nach einem Zuwarten von 10—20 Minuten einen schwach braunen Ring. Eine 10mal verdünntere Lösung erzeugt ihn kaum mehr merklich, selbst bei sehr langem Zuwarten. Aber es fehlt auch hier vollständig die grüne Phase.

Aethylalkohol ergibt keine Ringreaktion; auch nicht normale Harnbestandteile. Ferner haben wir pathologische nicht

endecken können. Salicylate, resp. deren Ausscheidungsprodukte. sowie Barbiturate ergeben wohl, in höherer Konzentration, einen braunen Ring. Aber die primäre Grünfärbung des Ringes oder der überstehenden Flüssigkeit fehlt vollständig.

Nach obigen Ausführungen ist es verständlich, dass die Herstellung eines Trockenreagens auf Acetessigsäure nicht allzu schwer sein konnte. Alkalilauge können wir natürlich nicht inkorporieren, wohl aber Alkalikarbonat. Wie beim Acetonreagens muss mit viel Karbonat und wenig Flüssigkeit gearbeitet werden, um eine gute Massenwirkung zu erhalten. Wir erhielten ein gutes Reagens, indem wir 4 g gepulvertes Ferricyancalium mit 30 g anhydrischem Natriumkarbonat pro analysi mischten. Das Pulver ist vollstandig trocken und hält sich ohne besondere Vorsichtsmassnahmen sehr lange Zeit. Geringe Abweichungen von obiger Formel verändern die Empfindlichkeit nicht wesentlich.

Wir verwenden das Reagens wieder in unseren kleinen Reagenzgläschen von 1 cm Durchmesser und 4 cm Länge. Wir geben in ein solches Gläschen, das vollständig trocken sein muss, das Reagenzgemisch auf etwa 6 mm Höhe. Tropfenweise wird die zu untersuchende Flüssigkeit zugegeben, bis sie einige mm über dem Pulver steht. Es wird nicht umgeschüttelt. Sofort muss beobachtet werden. Ist wenig Acetessigsäure vorhanden, so ist nämlich die erste Phase, die Grünfärbung, eine wenig intensive und flüchtige. Da schon Wasser eine grünlichgelbe Färbung erzeugt, wird man, bei wenig Uebung, gut daran tun, gleichzeitig mit Normalharn eine Vergleichsreaktion mit gleichen Mengen anzustellen. Der Unterschied wird dann evident. Grössere Mengen Acetessigsäure lassen die smaragdgrüne Färbung des Pulverbodensatzes sehr deutlich wahrnehmen. Auch wird die überstehende Flüssigkeit rasch grün. In kurzer Zeit wird das Pulver immer dunkler grün. Man sieht die topochemische Reaktion deutlich um die Ferricyankali-Partikelchen im Karbonat entstehen. Als Endreaktion erhalten wir im Bodensatz eine schmutzige Braunfärbung. Die überstehende Flüssigkeit schägt von grün in braungelb bis braunrot um. Immer ist die Färbung wesentlich dunkler, als ein Normalharn ergibt.

Beide Phasen der Färbung: grün zuerst, braun nachher, sind also auch hier typisch und müssen verlangt werden, soll die die Reaktion als positiv angesehen werden.

Acetonhaltiger Harn, ohne Acetessigsäure, sowie wässerige Acetonlösung ergeben keine Grünfärbung. Es fehlt, ausser bei sehr hoher Konzentration, auch die Braunfärbung des Bodensatzes (im Gegensatz zur „nassen" Ringprobe mit Alkalilauge), wie der Flüssigkeit, indem die Alkalinität keine genügende zu sein scheint. Starke Konzentrationen von Salicylaten lassen die grüne Phase, wie oben, ganz vermissen. Eine braune Endfärbung kann aber auftreten. Das Gleiche gilt von Barbitursäurederivaten.

Gibt ein acetonhaltiger Harn keine deutlich positive Reaktion auf Acetessigsäure, so können wir oft eine deutlichere erhalten, wenn wir enolisieren. Ist der Harn alkalisch, so brauchen wir dies natürlich nicht zu tun. . In ein kleines Gläschen geben wir einen Tropfen 10%ige Natronlauge und füllen vollständig mit Harn auf. Nach einem Zuwarten von etwa 10 Minuten erhalten wir eine typische Reaktion, wenn wir wie gewöhnlich verfahren. Es wird also auch hier das Enol nachgewiesen.

Was die Empfindlichkeit betrifft, so kann gesagt werden, dass dieselbe eine sehr hohe ist. Wie oben für die Ringprobe mit Acetessigester ist dieselbe eine etwa 10mal grössere als für die Gerhardt'sche Reaktion, wenn enolisiert worden war, natürlich.

β-Oxybuttersäurehaltige Harne geben keine Reaktion, weder eine grüne, noch eine finale braune.

β-Oxybuttersäurenachweis.

Wir sagten schon eingangs, dass es möglich ist, auch die β-Oxybuttersäure chemisch in einfacher Weise mit Hilfe von Trockenreagenzien nachzuweisen. Es sind mehrere chemische Verfahren beschrieben worden, die, weil sie recht kompliziert sind, in neueren Leitfäden der Harnanalyse nicht mehr erwähnt werden. Der polarimetrische Nachweis, der sich bei zuckerhaltigem Harn recht kompliziert gestaltet, dürfte für den Praktiker kaum in Betracht fallen. Wir brauchen die Methode nach E. Meyer, welche die Oxybuttersäure im durch Gärung entzuckerten Harn in Krotonsäure überführt, nicht zu erwähnen, da Eisencyankomplexsalze dabei nicht verwendet werden. Emden & Schmitz (Sahli[3]) oxydieren, nach Verdampfen der Acetessigsäure und des Acetons, die β-Oxybuttersäure mit Wasserstoffsuperoxyd bei Gegenwart von Ferrosulfat. Die entstandene Acetessigsäure wird mit Ferrichlorid nachgewiesen. Man kann auch mit einem salzsauren Aetherextrakt arbeiten, den man eindampft, mit Wasser aufnimmt, eventuelle Acetessigsäure abdampft, mit Wasserstoffperoxyd und Ferrosulfat versetzt. Sahli (loc. cit.) beschreibt ferner das Verfahren von Stuart Hart, welcher ähnlich verfährt: Oxydation ebenfalls mit Wasserstoffsuperoxyd, nach Abdampfen von Aceton und Acetessigsäure. Nachweis mit der Lange'schen Acetonprobe.

Wir verdampfen bei unserer Methode ohne Säurezusatz etwa 10 cc Harn. Eine Einengung auf etwa die Hälfte des Ausgangsvolumens genügt meist, um Aceton und Acetessigsäure zu entfernen. Zur Prüfung verwenden wir unsere Trockenreagenzien. Ist alles Aceton weg, aber ist noch Acetessigsäure vorhanden, so können wir, vor weiterem Eindampfen, mit einigen Tropfen Essigsäure versetzen. Ist auch keine Acetessigsäure mehr nachweisbar, so filtrieren wir, da Salze ausgefallen sind, die stören könnten. Wir können hierauf mit Wasser auf das Ausgangsvolumen auffüllen, was aber nicht notwendig izt. Wir versetzen ca. 5 cc mit einigen Körnchen Ammoniumpersulfat in Substanz und schütteln um. Schon nach einigen Minuten können wir das Aceton nachweisen. Besonders rasch und deutlich tritt die

Umwandlung in Aceton auf, wenn wir im Wasserbad einige Minuten gelinde erwärmen. Setzen wir vor dem Eindampfen etwas Essigsäure zu, so empfiehlt es sich, mit etwas Karbonat in Substanz zu alkalinisieren.

Zum Anstellen der Acetonreaktion verwenden wir die übliche Menge Acetonreagens in einem kleinen Gläschen, dem wir ein ungefähr gleiches Volumen Natriumkarbonat in Substanz beifügen. Nach Durchmischung geben wir die gewöhnliche Flüssigkeitsmenge wie für die Acetonreaktion dazu. Die positive Reaktion tritt etwas langsamer auf. Auch erhalten wir keine deutliche Violettfärbung, sondern eine mehr rosarote, die auf die Flüssigkeit übergeht. An dieser Abweichung ist die Gegenwart von Persulfat schuld. Eine wässerige Natriumpersulfatlösung allein ergibt aber keine Rotfärbung.

Eine typische Acetonreaktion erhalten wir, wenn wir ca. 5 cc des mit Persulfat versetzten Harns (oder Oxybuttersäurelösung) in einen kleinen Erlenmeyer geben, mit Kork verschliessen und mit einem Kühler verbinden. Beim Erhitzen erhalten wir in der Vorlage nach kurzer Zeit einige Tropfen Aceton, mit dem wir eine schöne Reaktion erhalten. Es ist nicht notwendig einen wasserdurchströmten Kühler zu verwenden. Ein langes, luftgekühltes Glasrohr, oder eine 20 cc haltende Pipette genügen vollständig, um einige Tropfen Aceton zu erhalten.

Wir können auch so verfahren, dass wir einen Rückflusskühler verwenden und einige Minuten zum Sieden erhitzen. Die Störung durch das Persulfat wird dadurch ebenfalls eliminiert. Destillieren wir ab, so ist es empfehlenswert, vor dem Destillieren die 5 cc Flüssigkeit mit 1—2 Tropfen Essigsäure zu versetzen. Dadurch wird die zuerst enstehende Acetessigsäure ketonisiert, so dass ein glatter Uebergang in Aceton garantiert wird.

Uebrigens kann man oft, sowohl wenn man mit nicht angesäuertem Harn oder mit einer schwachen Oxybuttersäurelösung ohne Essigsäurezusatz unter Rückflusskühlung arbeitet, die intermediär entstehende Acetessigsäure erfassen, wenn man nicht zu lange destilliert. Wir können diese entweder mit dem

Acetessigsäurereagens oder mit dem Acetonreagens nachweisen. In letzterem Falle, wenn noch kein Aceton gebildet worden ist, erhält man eine Orangefärbung (siehe Kapitel Aceton). Mit Ferrichlorid können wir die Acetessigsäure nicht nachweisen, da meist zu wenig vorhanden ist.

Mit einer reinen β-Oxybuttersäurelösung haben wir feststellen können, dass es gelingt, ohne Destillation eine Konzentration von 1/1000 nachzuweisen. Wenn wir destillieren, können wir eine solche von 1/2000 noch sehr schön erfassen.

Eine quantitative Schätzung des β-Oxybuttersäuregehaltes ist aber nicht möglich. Es handelt sich um einen rein qualitativen Nachweis.

Zusammenfassung.

1) Es wird berichtet, dass die rote Reaktion des Nitroprussidnatriums in alkalischem Milieu von v. Bitto näher untersucht worden ist. Sie ist typisch für Aldehyde und Ketone, tritt aber für aliphatische Verbindungen nur auf, wenn die Aldehyd- resp. Ketongruppe an eine solche gebunden ist, die nur aus C und H besteht. Für aromatische Verbindungen tritt sie nur auf, wenn aliphathische Seitenketten vorhanden und obige Bedingungen in den Seitenketten ebenfalls erfüllt sind.

2) Auf Säurezusatz tritt für eine Anzahl von Verbindungen, die obige Rotfärbung ergeben, eine Entfärbung auf. Für andere bleibt sie bestehen, oder der rote Farbton wird modifiziert. Für die uns interessierenden Harnbestandteile geben Kreatinin Entfärbung, Aceton und Acetessigsäure Weiterbestehen (und Modifikation) der Rotfärbung (Legal'sche Reaktion).

3) Statt Alkalilauge kann nach Rothera Ammoniak verwendet werden. Nachträglicher Zusatz von Ammoniumsalz wirkt wie Säurezusatz. Es entsteht eine permanganat-violette Komplexverbindung.

4) Diese von Rothera angegebene Modifikation ist prinzipiell nicht verschieden von der Lange'schen Reaktion, indem bei letzterer durch den Säurezusatz vor dem Ammoniakzusatz Ammoniumsalz entsteht.

5) Wir beschreiben verschiedene mögliche Modifikationen der Rothera'schen, resp. Lange'schen Reaktion. Statt Ammoniak + Ammoniumsalz kann letzteres allein zugesetzt werden und das Ammoniak kann aus letzterem im Reaktionsgemisch mit Alkalilauge oder Alkalikarbonat erzeugt werden. Statt Ammoniumsalz kann auch Formamid mit Ammoniak oder Alkalilauge oder Karbonat verwendet werden.

6) Aus letzterer Möglichkeit sehen wir die Zusammensetzung von Trockenreagenzien vorgezeichnet. Das einfachste besteht aus Nitroprussidnatrium, Natriumkarbonat und Ammoniumsulfat. Letzteres kann durch adsorbiertes Formamid ersetzt werden.

7) Die festen Reagenzien weisen nur Aceton, nicht aber Acetessigsäure nach, gleich wie die Rothera'sche und Lange'sche Reaktion.

8) Es wird eine neue Reaktion auf Acetessigsäure beschrieben, die darin besteht, dass Ferricyankalium in alkalischer Lösung verwendet wird. Am besten stellt man sie als Ringprobe durch Unterschichten mit Alkalilauge an.

9) Diese Reaktion kann auch mit einem Trockenreagens, bestehend aus Ferricyankalium und Natriumkarbonat, angestellt werden. Bei beiden Reaktionen entsteht eine primäre Grünfärbung mit darauffolgender sekundärer Braunfärbung. Letztere treffen wir auch bei anderen Verbindungen an, während beide Phasen nur bei Acetessigsäuregegenwart vorzukommen scheinen, wenigstens was normale und pathologische Harnbestandteile betrifft.

10. Es wird die Möglichkeit des chemischen Nachweises der β-Oxybuttersäure beschrieben, indem nach Austreiben durch Wärme der vorhandenen flüchtigen Ketonkörper die verbleibende β-Oxybuttersäure mit Ammoniumpersulfat in Substanz zu Acetessigsäure oxydiert und letztere als Aceton nachgewiesen wird.

Literatur.

1) Lipp: Acetonbefunde und Acetonnachweis im Harn. Ars Medici 1928, No 5, pag. 259.

— Untersuchungen für die Allgemeinpraxis. 3. Aufl., Lehmann, München 1939, pag. 35.

2) Sahli: Lehrbuch der klinischen Untersuchungsmethoden. 7. Aufl., Franz Deuticke, Leipzig und Wien, pag. 81.

3) M. Weiss: Diagnose und Prognose aus dem Harn. Weidmann & Cie.' Leipzig-Bern 1936.

4) Agasse-Lafont: Les applications pratiques du laboratoire à la clinique. Vigot frères, Paris 1929.

5) Stockbauer: Urinuntersuchungen und ihre diagnostische Anwendung Müller & Steinicke, München 1936.

6) Sahli: ibidem, pag. 73.

7) Legal: Ueber eine neue Acetonreaktion und deren Verwendbarkeit zur Harnuntersuchung. Centralbl. f. Ch. 1883, pag. 652.

8) v. Bitto: Ueber das Nitroprussidnatrium als Reagens auf Aldehyde und Ketone. Lieb. Ann. 267, 1892, pag. 372.

9) Rothera: Notiz über die Nitroprussitnatriumreaktion des Acetons. Centralbl. Ch. 1909, I, 402.

10) Enrico Rimini: Neue Reaktion des Acetons und neue Methode zur Unterscheidung aliphatischer Amine. Centralbl. Ch. 1898, II, 133.

11) Campi: Ueber Farbreaktionen des Nitroprussidnatriums. Centralbl. Ch. 1927, II, 681.

12) Zwikker: Beiträge zur Kenntnis der Reaktion von Legal. Centralbl. Ch. 1930, II, 2120 (Pharm. Weekbl. 67, 560, 1930).

13) Ephraim: Anorganische Chemie. 4. Aufl., Steinkopf, Dresden und Leipzig 1929, pag. 263 ff.

14) Fleischmann: Nachweis von Aceton im Harn. Centralbl. Ch. 1914, I, 1784.

15) Roesler: Modifikation der Lange'schen Acetonreaktion. Centralbl. Ch. 1917, II, 497.

16) Trenkel: Nachweis von Aceton im Harn. Centralbl. Ch. 1918, I, 877.

17) Bohrisch: Der Nachweis von Aceton im Harn. Centralbl. Ch. 1918, I, 1195.

18) Adler: Ein Acetonurometer. Centralbl. Ch. 1919, IV, 398.

19) Schael: Die Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure mit dem Authenrieth'schen Colorimeter. Centralbl. Ch. 1919, IV, 562.

20) Wagenaar: Nachweis von Aceton im Harn. Centralbl. Ch. 1918, I, 778.

21) Bigwood & Ladd: Die qualitativen Proben für Acetonkörper, ihre Bedeutung und ihr Wert. Centralbl. Ch. 1924, I, 947.

22) Van Uerk: Das Verhalten verschiedener Ammoniumsalze bei der Reaktion von Rothera. Centralbl. Ch. 1925, I, 994.

23) Lawrence R. D.: Comment doit vivre le diabétique. Baillière & fils, Paris 1928, pag. 197.

24) Karrer: Lehrbuch der organ. Chemie, 7. Auflage 1941.

25) Hollemann: Lehrbuch der organ. Chemie. 18. Aufl., de Gruyter & Co., Berlin und Leipzig, 263.

26) Sahli: ibidem, pag. 80.

27) Lawrence: ibidem, pag. 198 f.